Münster 1935 No 68 Phil DiSS

Chemie

Ueber die Reinigung der Carboxylase.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Philosophischen und Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Westfälischen Wilhelms-Universität Münster i. W.

vorgelegt von

Heinz Wrede

aus Münster i. W.

1934

Buchdruckerei Thiele, Gütersloh i. Westf.

Chemie

Ueber die Reinigung der Carboxylase.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Philosophischen und Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Westfälischen Wilhelms-Universität Münster i. W.

vorgelegt von

Heinz Wrede

aus Münster i. W.

1 9 3 4

Buchdruckerei Thiele, Gütersloh i. Westf.

Tag der mündlichen Prüfung: 16. November 1934.

Dekan: Herr Prof. Dr. A. Baumstark,

Referent: Herr Prof. Dr. W. Langenbeck,

Korreferent: Herr Geheimrat Prof. Dr. R. Schenck.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Meinen Eltern.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555426_0253

Die chemische Konstitution der Fermente ist bis heute noch ungeklärt. Versuche zu ihrer Reindarstellung sind noch nicht geglückt. Sumner und Northrop gelang es kristalline Eeiweißstoffe zu erhalten, die starke Fermentwirkung besaßen. Allerdings ist das Protein wahrscheinlich nicht der wirksame Bestandteil, sondern nur der kolloide Träger.

Gewiß spielt bei der Reaktion der kolloide Verteilungszustand des Fermentes eine Rolle, aber im wesentlichen muß die Wirksamkeit der Fermente einer bestimmten aktiven Gruppe zugesprochen werden, die durch aktivierende Gruppen dann reaktionsfähig wird.

Die Carboxylase findet sich außer in einigen Pflanzen besonders in der Hefe. Ihre Wirkung beruht auf der Zersetzung von α-Ketosäuren in Aldehyd und Kohlendioxyd. In dieser Eigenschaft spielt sie bei der alkoholischen Gärung eine wichtige Rolle.

Langenbeck und Mitarbeiter haben schon früher Katalysatoren synthetisiert, die stark carboxylatische Wirkung besitzen. Diese Katalysatoren enthalten alle eine freie Aminogruppe. Je mehr sich nun die Wirkung dieser Katalysatoren der Fermentwirkung nähert, umso wahrscheinlicher ist es auch, daß die Carboxylase ein primäres Amin ist. Außer der oben erwähnten Spaltung von Brenztraubensäure besitzt die Carboxylase noch die Fähigkeit zur Bildung von Acetoin. Acetoin entsteht, wenn man Brenztraubensäure bei Gegenwart von Acetaldehyd vergären läßt. Da Acetaldehyd mit Hefe kein Acetoin bildet, muß das andere Molekül Acetaldehyd von der Brenztraubensäure gebildet sein, welches sich mit dem fertigen Molekül Acetaldehyd in statu nascendi zum Acetoin zusammenlagert. Die beiden Vorgänge sind also eng miteinander verknüpft. Während Neuberg und Hirsch die Acetoinbildung einem besonderen Ferment, der Carboligase, zuschreiben, sind Langenbeck und Dirscherl der Meinung, daß die Carboxylase allein die Acetoinbildung bewirkt, da auch die Carboxylasemodelle bereits Acetoin bilden. Um diesen Beweis zu führen, mußten hochgereinigte Hefesäfte hergestellt werden, die bei einem geringen Trockengewicht noch immer stark carboxylatische Wirkung besaßen. Wir haben die Acetoinbildung vom Rohsaft angefangen über alle Reinigungsstufen der Carboxylase bis zu den hochgereinigten dialysierten Säften mit geringem Trockengewicht gemessen. [1]) Da auch in diesen

[1]) Die Acetoinbestimmungen wurden von Herrn Walter Schlockermann ausgeführt.

hoch gereinigten Säften mit stark carboxylatischer Wirkung das Verhältnis von gebildeter Menge Acetoin zur entwickelten Menge Kohlendioxyd stets annähernd konstant blieb, ist wahrscheinlich gemacht, daß Carboxylase und Carboligase ein und dasselbe Ferment ist. In dieser Arbeit soll nur die Reinigung der Carboxylase beschrieben werden. Jedoch wird auf die Carboligasemessungen bei den verschiedenen Säften auch schon hier verwiesen.

Während die Carboxylase in den Rohsäften verhältnismäßig stabil war, wurde sie in den gereinigten Säften immer unbeständiger. Hierin liegt auch wohl der Grund, weshalb Fermente bisher noch nicht isoliert werden konnten.

Von F.F. Nord wurde beobachtet, daß sich die Zymase im eingefrorenen Zustande längere Zeit hielt. Wir benutzten ebenfalls für unsere Arbeiten diese Erfahrung. Da aber das Auftauen größerer Mengen Hefesaft längere Zeit dauert, und während dieser Zeit das Ferment schon merklich zerstört wird, versuchten wir die Lösung durch Zusatz von anderen Stoffen noch bei —22° flüssig zu halten. Als bestes erwies sich Zusatz von einem halben Volumen Methanol; die Carboxylase ist bei dieser Temperatur sehr gut haltbar und wird auch nach Wochen kaum merklich zerstört.

Auf Zusatz von Methanol und Essigsäure wird bereits ein großer Teil der Eiweißstoffe gefällt, während die Carboxylase dabei in Lösung bleibt. Um den Rest der Eiweißstoffe zu entfernen, wurde die Tanninfällung angewandt, wobei unter besonderen Bedingungen die Carboxylase nicht mitgerissen wird. Demnach scheint das Ferment kein Protein zu sein. Durch geeignete Wahl der Tanninmengen erhält man so ein eiweißfreies Filtrat, welches noch starke carboxylatische Wirkung besitzt. Ein geringer Überschuß an Tannin wurde mit Hautpulver entfernt, das sich für diese Zwecke ausgezeichnet verwendbar erwies, ohne größere Fermentmengen zu adsorbieren. In diesem eiweißfreien Filtrat wurde dann das Ferment an Tonerde adsorbiert, und davon durch Elution mit primärer Phosphatlösung wieder losgelöst.

Wie schon erwähnt, war die Carboxylase in diesen hoch gereinigten Säften aber so unbeständig, daß ihre Wirksamkeit bereits während der Messung stark abfiel. Hinzukommt noch, daß die Tanninfällung nicht immer befriedigend verläuft, sondern von mancherlei Zufälligkeiten abhängig ist. Da nun für die Carboligase-Messungen eine längere Versuchsdauer nötig war, mußten wir auf andere Weise zu stabilen gereinigten Säften gelangen.

Bei der neuen Arbeitsmethode wurde natürlich die Methanolfällung beibehalten. Der so erhaltene Rohsaft wurde dann viermal mit Kaolin geschüttelt, ohne daß dadurch die Aktivität des Fermentes wesentlich geschwächt wurde. Durch diese aneinandergereihten

Kaolinadsorptionen wurde dagegen schon eine weitgehende Befreiung von Eiweißstoffen erzielt. An diese Adsorptionen schloß sich dann eine oder mehrere Tonerdeadsorptionen an. Zuerst wurde mit Tonerde B in wässriger und 33% methanolischer Lösung, später mit Tonerde C in methanolischer Lösung gearbeitet. Je nach der Zeitdauer der Adsorption gelang es, das Ferment an die Tonerde zu bringen, oder durch die Tonerde nur Eiweiß zu fällen ohne das Ferment mitzufällen. Als gut geeignetes Eiweißfällungsmittel erwieß sich später methanolische Tonerde C. Von den Tonerdeadsorbaten wurde das Ferment dann mit primären Phosphat, oder mit Phosphatpuffer p_H 6. 4. eluiert. Diese Elutionen wurden dann bei —20° gegen verdünnten Methanol dialysiert. Bei den späteren Versuchen mit Tonerde C konnte man die Tonerdeadsorption und Elution sparen, da wie erwähnt, Tonerde C sich als vorzügliches Eiweißfällungsmittel erwies, ohne nennenswerte Fermentmengen zu adsorbieren.

Auf diese Weise kam man dann zu fast eiweißfreien stark aktiven Säften, die sofort bei —20° dialysiert wurden. Enthielten diese Säfte nach der Tonerdeadsorption doch noch größere Mengen Eiweiß, so ließ sich noch leicht eine Kaolinadsorption einschalten, die dann zu den gewünschten fast eiweißfreien Säften führte. In einem Falle gelang es, nach solch zwischengeschalteter Kaolinadsorption bei einer Dialyse einen eiweißfreien Saft zu erhalten, der noch starke Carboxylasewirkung besaß. Allerdings fiel die Aktivität während der Messung wie bei den tanningefällten Säften so sehr ab, daß eine Carboligasemessung damit nicht ausgeführt werden konnte. Nach der meist achttägigen Dialyse wurden dann die Carboxylase- und Carboligase-Bestimmungen ausgeführt. Bei der Dialyse bei —20° fällt das Ferment an Globulin gebunden, am Boden des Dialysators aus. Da nach einer solchen Dialyse die Carboxylasemessungen mit und ohne Kochsaft fast die gleiche Aktivität besaßen, spielt die CO-Carboxylase bei den von uns verwendeten Heferassen offenbar nicht die wesentliche Rolle, die A u h a g e n [1]) ihr zuschreibt.

Versuchsteil. [2])

Als Ausgangsmaterial für die Mazerationssäfte diente gewaschene und gepreßte Brauerei-Unterhefe der Germania-Brauerei Münster und des Hacker-Bräu München. Bei diesen Untersuchungen zeigte sich, daß die Mazerationssäfte aus Hackerhefe bedeutend

[1]) H o p p e - S e y l e r 204/32; 204/149; 209/21.
[2]) Es werden nur die wichtigsten Versuche angeführt.

stabiler waren; selbst nach 24stündigem Stehen bei Zimmertemperatur, nur wenig an Aktivität verloren hatten. Infolgedessen wurde Germania-Hefe nur anfangs genommen, für die späteren Versuche wurde stets Hefe des Hacker-Bräu München benutzt. Die Hefe wurde zunächst durch ein feines Sieb aus verzinktem Eisendraht gepreßt, auf eine große Oberfläche ausgebreitet und dann mehrere Tage bei Zimmertemperatur getrocknet. Die so erhaltene Trockenhefe ließ sich monatelang zu Versuchen gebrauchen. Die Zeitdauer der Mazeration betrug zuerst 3 Stunden, bei späteren Versuchen wurde sie auf 5 Stunden erhöht. Außerdem wurde bei diesen Versuchen nur die $1^1/_2$fache Gewichtsmenge Wasser zur Hefe gesetzt, die restliche Wassermenge erst vor dem Zentrifugieren.

Die Aktivität der Carboxylaselösungen wurde durch Messung in Warburg-Barcroft Manometern in einem Thermostaten von + 20° bestimmt, und zwar wurde der Manometerstand alle 5 Min. abgelesen. Als Substrat diente Brenztraubensaures Natrium, das in einem 0,3 mol. Acetatpuffer (p_H 4,7) gelöst wurde. Diese Pufferlösungen wurden der Zersetzlichkeit der Brenztraubensäure wegen jeden Tag neu angesetzt. Später erwies sich die Fermentwirkung wesentlich günstiger bei einer Acidität p_H 6—7, da bei gereinigten Säften Inaktivierung bei p_H 4,7 eintrat. Als Puffer für diese Versuche wurde 0,3 mol. Phosphatpuffer p_H 6,4 benutzt, in dem das Substrat ebenfalls gelöst wurde. Als optimale Substratkonzentration wurden bereits früher 2 mg Brenztraubensaures Natrium in einem ccm Puffer gefunden.[1]) In jeden Atmungstrog wurden 0,25 ccm Fermentlösung und 1,75 ccm Puffer eingefüllt, später wurden 0,5 ccm Puffer durch Hefekochsaft ersetzt.

Als Carboxylaseeinheit definiert man diejenige Fermentmenge, die in einer Minute bei der angegebenen Substratkonzentration und Acidität 1 mm^3 CO_2 freimacht.

Der Carboxylasewert ist die Zahl der Carboxylaseeinheiten in einem mg Trockengewicht = C.E./mg.

Die Aktivität wird in C.E./ccm ausgedrückt.

Carboligatischer Quotient = C.Q. ist das Verhältnis von gebildeten Molen Acetoin zu entwickelten Molen Kohlendioxyd.

Die Hefe wurde mit der dreifachen Gewichtsmenge Wasser breiig angerührt, dann drei Stunden im Thermostaten bei + 30° gehalten und zentrifugiert. Dieser Saft, z. B. 5ccm, wurde mit Wasser auf 50 ccm aufgefüllt. Dazu kamen 5 ccm 0,3 mol. Essigsäure. Darauf wurde an 5 g Kaolin unter Schütteln adsorbiert und zentrifugiert.

---

[1]) Langenbeck und Mitarbeiter Hoppe-Seyler, Bd. 221, Heft 1 und 2.

Dieser kaolinadsorbierte Saft wurde mit einer Tonerde B-Suspension 5 Min. geschüttelt, die Tonerde dann abgeschleudert. Die Adsorption des Fermentes an Tonerde wurde durch Messung des Adsorbates und des überstehenden Saftes gemessen.

Versuch 8.

So wurden z. B. 10 ccm kaolin-adsorbierter Saft an 2 ccm Tonerde B adsorbiert. Nach dem Zentrifugieren wurde der überstehende Saft abgegossen, das Adsorbat in 2 ccm H_2O suspendiert.

Der kaolin-adsorbierte Saft entwickelte in 20 Min. 75,98 mm^3 CO_2, das Tonerdeadsorbat 67 mm^3, während die Aktivität des überstehenden Saftes nur 9,8 mm^3 CO_2 betrug. Das Ferment ist also praktisch vollkommen an die Tonerde B adsorbiert. Zu dieser Messung wurden in den Atmungstrog 16 mg $CH_3COCOONa$ eingewogen, dazu kamen 0,5 ccm Fermentlösung und 1,5 ccm Acetatpuffer. Die Konzentration der Tonerde B beträgt 7,36 mg Al_2O_3 in einem ccm.

Versuch 11.

Bei weiteren Versuchen wurde das Tonerdeadsorbat aus 10 ccm Saft und 2 ccm Tonerde B noch zweimal mit 5 ccm H_2O gewaschen, dann in 2 ccm H_2O aufgerührt und gemessen. Zu dieser Messung wurden 0,25 ccm Fermentlösung, 0,75 ccm Puffer und 8 mg CH_3CO-$COONa$ in den Trog eingefüllt.

Das Tonerdeadsorbat entwickelte in 20 Min. 23,2 mm^3 CO_2 = 4,64 C. E./ccm., nach 24stündigem Stehen bei 0° betrug die Aktivität noch 4,2 C. E./ccm. Die Aktivität des Adsorbates ist also während dieser Zeit nur sehr wenig herabgesunken.

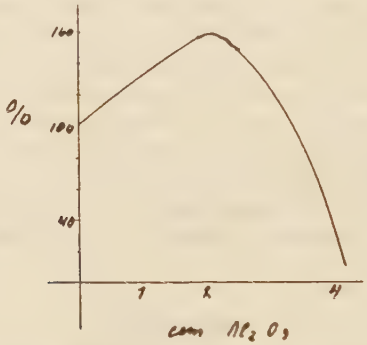
Ein Versuch mit größeren Hefemengen verlief ergebnislos, höchstwahrscheinlich dadurch, daß die Kaolinadsorption in einer verbleiten Wanne durchgeführt wurde.

Versuch 18.

Bei einem neuen Mazerationssaft wurden nach der Adsorption an Kaolin je 10 ccm dieses Saftes mit 1, 2 und 4 ccm Tonerde B versetzt. Nach kurzem Schütteln wurde zentrifugiert, die über den Tonerdeniederschlägen stehenden klaren Säfte neben dem kaolinadsorbiertem Saft vergleichend gemessen.

Kaolin	1 ccm Tonerde	2 ccm Tonerde	4 ccm Tonerde
6,37	8,89	8,42	1,85
10,8	14,05	14,01	3,21
15,32	20,1	18,1	3,6
20,56	27,0	25,26	4,38

Nehme ich die entwicklten Mengen CO_2 in den ersten 5 Min. als Maß an, und setze die vom Kaolin adsorbierten Saft entwickelte Menge CO_2 willkürlich = 100%, so entsteht nachstehende Kurve 1.



Die Kurve erhellt die Abhängigkeit der Fermentadsorption an steigenden Mengen Tonerde B, gemessen an den überstehenden Säften. Auf der Abszisse sind die Mengen Tonerde in ccm, auf der Ordinate die Anzahl der entwickelten mm^3 CO_2 aufgetragen. Da wir von 10 ccm Saft ausgegangen sind, muß man für das durch die Tonerde vergrößerte Flüssigkeitsvolumen natürlich eine Korrektur anbringen. Es ergibt sich dann:

kaolinadsorbierter Saft	= 100 %
mit einem ccm Tonerde B	= 130,13%
mit 2 ccm Tonerde B	= 158,64%
mit 4 ccm Tonerde B	= 40,64%.

Es findet also auf Zusatz von 2 ccm Tonerde B eine Steigerung auf 158% statt, während größere Mengen Tonerde das Ferment adsorbieren. Die 3 erhaltenen Tonerdeadsorbate wurden dreimal gewaschen und dann mit soviel H_2O aufgerührt, als Tonerde zugesetzt war. Bei dieser Messung bestätigte sich dann die obige Kurve. Das mit 2 ccm Wasser aufgerührte Adsorbat entwickelt 7,2 mm^3 CO_2 in 20 Min. mit 4 ccm 37,72 mm^3 CO_2. Versuche der Mazerationssäfte, durch besonders sorgfältige Reinigung des Wassers die Stabilität zu erhöhen, verliefen ergebnislos, ebenso ein Mazerationsversuch mit 30prozentigem Methanol.

Versuch 24.

Saft 8. Bei den jetzt folgenden Versuchen wurde die Hefe mit der dreifachen Gewichtsmenge Wasser angerührt und drei Stunden bei + 30° mazeriert. Der abgeschleuderte Hefebrei wurde dann nochmals mit derselben Menge Wasser gewaschen, dann zentrifugiert. Konzentrierter Mazerationssaft und Waschwasser wurden zusammengegeben. Zu diesem Volumen wurde darauf das halbe Volumen Methanol gesetzt und nach einiger Zeit das ausgefällte Eiweiß abgeschleudert.

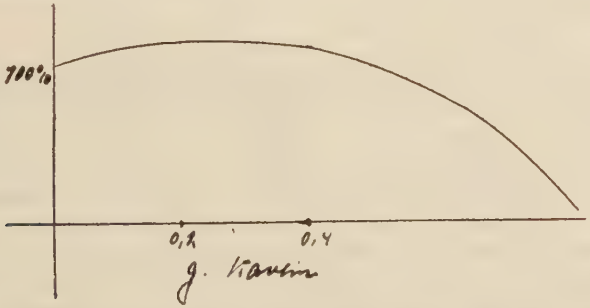
Als Optimum der Essigsäuremenge ergab sich 2 ccm 0,3 mol. Essigsäure auf 10 ccm methanolischem Saft.

Versuch 31.

Kaolinadsorptionsversuche: Der Rohsaft enthielt 22,7 C.E./ccm.

mit 0,1 g Kaolin auf 5 ccm Saft 26,4 C.E./ccm
mit 0,2 g Kaolin auf 5 ccm Saft 25,8 C.E./ccm

Die Kurve ergibt, wenn man die vom Rohsaft entwickelten mm^3CO_2 wieder = 100% setzt, ein Maximum bei 0,1 g. Kaolin. Da aber die Fermentadsorption an 0,2 g. Kaolin nur unwentlich schwächer war, wurde bei den weiteren Versuchen mit 0,2 g. Kaolin gearbeitet. Bei größeren Kaolinmengen, z. B. 1 g. bekommt man zu starke Verluste.



Adsorptionsversuche an Tonerde wurden natürlich auch mit methanolischer Tonerde ausgeführt. 50 ccm wässrige Tonerde wurden mit 25 ccm Methanol verdünnt. Der Gehalt an Al_2O_3 betrug 13,6 mg/ccm.

Eine Carboxylasewertbestimmung von 1:10 verdünntem Mazerationssaft ergab, da 0,5 ccm Fermentlösung 2,7 C.E./ccm enthielten, und das Trockengewicht von einem ccm 15,6 mg betrug:

$$C.W. = \frac{2,7}{15,6 \cdot 0,5} = 0,35\ ^{1}).$$

Versuch 32.

Carboxylasewertbestimmung eines kaolinadsorbierten Saftes mit 0,4 g. Kaolin auf 10 ccm Saft behandelt. 5ccm dieses Saftes wurden 6 Stunden in einem rotierenden Cellophandialysator gegen Wasser dialysiert. Der Saft wurde dann in einer Platinschale auf dem Wasserbade eingedampft und noch eine Viertelstunde im Trockenschrank bei 120° getrocknet. Daraus ergab sich, das Trockengewicht zu 17 mg/ccm. Der Saft entwickelte vor der Dialyse 128,9 mm^3 CO_2. Da 0,25 ccm zur Messung gebraucht waren, enthielt 1 ccm 25,76 C.E./ccm. Daher ist

$$C.W. = 1,515.$$

Versuche 37—39.

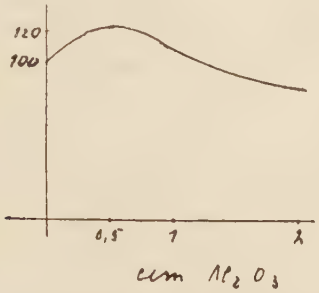
Saft 13. An solch einem mit 0,4 g Kaolin auf 10 ccm behandelten Safte wurden Adsorptionsversuche mit Tonerde B unternommen. Je 10 ccm des Saftes wurden mit 0,5, 1 und 2 ccm Tonerde B 5 Min. geschüttelt, die überstehenden Säfte nach dem Abschleudern der Tonerde wurden dann mit dem kaolinadsorbierten Safte vergleichend gemessen.

kaolinadsorbiert	0,5 ccm Tonerde	1 ccm Tonerde	2 ccm Tonerde
13,65	16,0	13,6	9,6
28,94	33,9	30,2	24,2
44,23	51,2	44,7	36,1
55,7 mm^3	65,35	56,1	45,8

Setze ich die vom kaolinadsorbierten Saft in den ersten 5 Min. der Messung entwickelte Menge CO_2 wieder = 100%, und bringe für die tonerdeadsorbierten Säfte die durch zugesetzte Tonerdesuspension vergrößerte Flüssigkeitsvolumen bedingte Korrektur an,

[1]) Diese Messung wurde bereits früher von Herrn Dr. Jüttemann ausgeführt.

so erhält man untenstehende Kurve. Zusatz von 0,5 ccm Tonerde bewirkt eine Aktivitätssteigerung auf 133%.



Bei den folgenden Versuchen wurde der methanolische Rohsaft zunächst an Kaolin adsorbiert, dann das Eiweiß mit 5 prozentiger methanolischer Tanninlösung gefällt. [1])

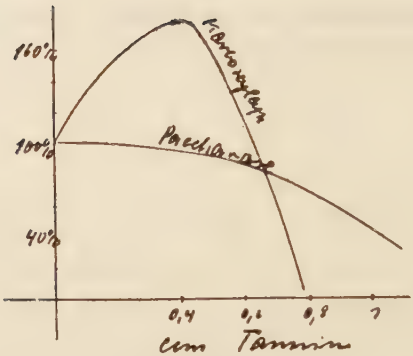
Versuch 51—53.

Saft 16. Nach der Kaolinadsorption wurden zu je 10 ccm Saft 0,4, 0,6, 0,8 ccm Tanninlösung gegeben, das ausgefällte Eiweiß abgeschleudert, darauf die überstehenden Säfte gemessen.

Der kaolinadsorbierte Saft entwickelte in 5 Min. 11 mm³ CO_2. Mit 0,6 Tannin 12 mm³ CO_2. Die Probe mit 0,4 und 0,8 ccm Tannin waren völlig inaktiv. Bei diesen Messungen wurde zunächst Fermentlösung (0,25), dann 0,5 ccm Kochsaft und 1,25 ccm Puffer in den Atmungstrog gefüllt. Bei der aktiven Messung mit 0,6 ccm Tannin wurde dagegen zunächst der Kochsaft, dann erst Fermentlösung und Puffer eingefüllt. Im Gegensatz zu den beiden anderen Proben war dieser Saft stark aktiv, außerdem völlig eiweißfrei. Ein geringer Überschuß an Tannin war vorhanden. Der mit 0,4 ccm Tannin gefällte Saft, der bei der ersten Messung inaktiv war, wurde jetzt auch in der Reihenfolge: Kochsaft — Fermentlösung — Puffer eingefüllt. Der ebenfalls völlig eiweißfreie Saft entwickelte jetzt in den ersten 5 Min. 19,5 mm³ CO_2. (Kurve).

---

[1]) Die Tanninfällungen wurden gemeinsam mit Herrn Otto Schäfer durchgeführt.



Auf der Abzisse sind die Tanninmengen in ccm, auf der Ordinate die entwickelten Mengen CO_2 der tanningefällten Säfte bezogen auf den kaolinadsorbierten Saft = 100% aufgetragen. Bei Zusatz von 0,4 Tanninlösung steigt die Aktivität auf 177%. Offenbar wird durch die Eiweißfällung eine Hemmung entfernt. Bei größeren Tanninmengen fällt die Kurve dann steil ab. Im Gegensatz zur Carboxylase fällt die Sacharasekurve bei steigenden Tanninmengen gleichmäßig ab.

Während die bisher beschriebenen Versuche mit Germania-Hefe ausgeführt wurden, sind die jetzt folgenden Untersuchungen mit Hackerbräu-Hefe unternommen. Mazerationssäfte dieser Hefe erwiesen sich bei Zimmertemperatur wesentlich aktiver. Selbst 24 stündiges Stehen bewirkte eine nur unwesentliche Aktivitätsschwächung.

Der wohl unvermeidliche geringe Tanninüberschuß wurde mit Hautpulver (Merck, Darmstadt) durch 1—2 stündige Behandlung bei —20° entfernt. Wesentlich war, daß das Hauptpulver mit dem betreffenden Saft gut aufgeschlämmt und öfter durchgerührt wurde. Als Optimum erwies sich 0,2 g Hautpulver auf 10 ccm Saft. Das Hautpulver wurde dann durch Absaugen auf einem groben Glassinterfilter entfernt. Die Säfte waren jetzt eiweißfrei und tanninfrei. (Prüfung mit Salicylsulfosäure und Eisenchlorid).

Versuch 71.

Zu diesen Säften wurde dann bei —20° Tonerdesuspension langsam zugegeben und zwar 2,5 ccmTonerde auf 10 ccm Saft. Diese Suspension wurde 5 Min. geschüttelt. Nachdem sie mehrere Stunden bei —20° sich selbst überlassen war, wurde die Tonerde abge-

schleudert. Der überstehende Saft wurde abgegossen, das Adsorbat dreimal mit der doppelten Menge 30 prozentigem gekühlten Methanol als Tonerde zugegeben war, gewaschen und dann schließlich in der halben Menge verdünntem Methanol gut aufgeschlämmt. Das so erhaltene Adsorbat von Saft 25 enthielt 3,38 C.E./ccm.

30 ccm $^1/_{10}$mol. KH_2PO_4 und 15 ccm Methanol wurden gut gemischt, davon 37,5 ccm, also die 5fache Menge zu 7,5 ccm des Tonerdeadsorbates gegeben, und 12 Stunden bei — 20° gehalten. Nach dem Abschleudern des Aluminiumphosphates betrug die Aktivität der klaren Elution 4,5 C.E./ccm. Da die Lösung jetzt fünfmal verdünnter ist, muß also auch die Aktivität um denselben Betrag gestiegen sein.

9 ccm der Elution des Saftes 25 wurden in einer Cellophanhülse 33 Stunden unter viermaligem Wasserwechsel dialysiert. Das Trockengewicht eines ccm betrug 0,33 mg, davon waren 0,16 mg Mineralsubstanz. Daraus berechnet sich:

$$C.W. = 13{,}64.$$

Als beste Fällungsmethode für Eiweiß erwies sich, zuerst Tannin einzufüllen, dann langsam den auf — 20° gekühlten Saft am Rande einfließen zu lassen, ohne schütteln oder zu rühren. Danach sofort das Eiweiß abschleudern, denn längeres Stehenlassen bedingt auf jeden Fall Fermentverluste. Wir haben die Tanninfällung immer im Zentrifugierglas durchgeführt.

Versuch 82.

Saft 31. 30 g Hefe wurden mit 90 g Wasser 3 Stunden bei + 30° mazeriert. Nach dem Zentrifugieren wurde der Hefebrei nochmals mit 90 ccm Wasser gewaschen. Nach Zusatz von Methanol und Essigsäure betrug das Gesamtvolumen 232 ccm. Nach dem Abschleudern des ausgefällten Eiweiß' verblieben noch 207 ccm Saft. Der Rohsaft enthielt 11,57 C.E./ccm.

Zu 4 Proben zu 0,8 ccm Tanninlösung wurden je 20 ccm gekühlter Rohsaft unter Drehen des Gefäßes langsam zugegeben, dann nach kurzer Zeit zentrifugiert. Die überstehenden Säfte nach der Tanninfällung enthielten:

4,73 14,68 19,7 und 13,6 C.E./ccm.

Diese 4 tanningefällten Proben wurden zusammengegeben (Volumen 62 ccm) und 1 Stunde bei — 20° mit 1,24 g. Hautpulver behandelt. Nach dem Filtrieren durch ein Glassinterfilter betrug das Volumen 55 ccm. Aktivität dieses Saftes 26,0 C.E./ccm. Der Saft war eiweiß- und tanninfrei. Bei diesen Messungen wurde das Manometer stets zunächst 5 Min. zum Temperaturausgleich bei offenem Hahn

im Thermostaten geschüttelt, der Hahn dann geschlossen und nach weiteren 5 Min. der Manometerstand abgelesen. In den zweiten 5 Min. der Messung betrug die Aktivität nur noch 7,9 C.E./ccm. Im weiteren Verlauf der Messung fiel sie dann immer mehr ab. Ähnliche Erfahrungen haben wir auch später bei anderen gereinigten Säften gemacht. Offenbar sind sie nur in der Kälte längere Zeit unverändert aktiv.

Zu 50 ccm des mit Hautpulver behandelten Saftes wurden 12,5 ccm Tonerde B gegeben, und eine halbe Stunde bei — 20° geschüttelt. Nach dem Zentrifugieren wurde der überstehende Saft abgegossen und gemessen. Das Adsorbat wurde dreimal mit 25 ccm gekühltem 30 prozentigen Methanol gewaschen, dann in 12,5 ccm verdünntem Methanol aufgeschlemmt und gemessen. Aktivität des Adsorbates 27,98 des überstehenden Saftes, 19,4 C.E./ccm. Allerdings fiel die Aktivität des überstehenden Saftes auch während der Messung sehr stark ab.

7,5 ccm des Tonerdeadsorbates wurden zu 37,5 ccm 30prozentiger methanolischer 0,1 mol KH_2PO_4-Lösung gegeben und 3,5 Stunden bei — 18° eluiert. Nach dem Zentrifugieren war das Volumen 42 ccm. Aktivität der Elution 24,3 C.E./ccm. Die Elution blieb während der Messung in gewissen Grenzen leidlich konstant.

19 ccm der Elution wurden drei Tage unter sechsmaligem Wasserwechsel dialysiert. Trockengewicht nach dem Eindampfen 3,3 mg, davon waren 1 mg mineralische Substanz.

$$\text{C.W.} = \frac{24{,}3 \,.\, 19}{3{,}3} = 140.$$

Versuch 84.

Saft 33. 20 g Hefe wurden mit 60 g Wasser 3 Stunden mazeriert. Der abgeschleuderte Hefebrei wurde dann nochmals mit 60 ccm Wasser gewaschen. Das Gesamtvolumen nach Zusatz von Methanol und Essigsäure betrug 162 ccm. Die Lösung wurde eine Stunde bei — 20° gehalten. Nach dem Abschleudern des ausgefällten Eiweiß betrug das Volumen 148 ccm. 4 Proben dieses Saftes zu 25 ccm wurden in der beschriebenen Weise mit Tannin gefällt. Zu je 1 ccm 5 prozentiger Tanninlösung wurden die Proben bis auf — 20° gekühlten Rohsaftes aus einer Pipette langsam am Rande unter ständigem Drehen des Gefäßes gegeben, noch 5 Min. gekühlt und dann abgeschleudert.

Die überstehenden Säfte enthielten 35, 61, 24 und 21 C.E./ccm. Die vier eiweißfreien Proben wurden zusammengegeben. (Volumen 72 ccm). Dieser mit Tannin gefällte Saft wurde dann mit 1,44 g. Haut-

pulver (0,2 g. auf 10 ccm Saft) gut angerührt und noch 1,5 Stunden bei — 20° gehalten. Das Hautpulver wurde dann abgesaugt. Das Filtrat war eiweiß- und tanninfrei. Das Volumen dieses Saftes betrug 57 ccm, die Aktivität 42,3 C.E./ccm.

Zu diesen 57 ccm wurden 14,25 aufgeschlämmte gealterte Tonerde B (30% methanolisch) gegeben. Die Tonerdesuspension wurde vor jeder Adsorption in einer Flasche mit Glasperlen eine viertel Stunde gut durchgeschüttelt. Konzentration an Al_2O_3 = 13,6 mg/ccm. Nach $^1/_2$ Stunde wurde die Tonerde abgeschleudert, das Adsorbat dreimal mit je 30 ccm 30prozentigem Methanol gewaschen und endlich in 14,25 ccm verdünntem Methanol aufgeschlemmt. Das Adsorbat war in den ersten 10 Min. der Messung stark aktiv, fiel aber im weiteren Verlauf dann ab. Aktivität des Adsorbates = 76,9 C,E,/ccm.

Zu 12,5 ccm des Tonerdeadsorbates wurden 62,5 ccm 30prozentige methanolische 0,1 mol. KH_2PO_4-Lösung gegeben und 3 Stunden bei — 20° eluiert.

Das Eluat wurde erst nach 50stündigem Stehen in einer Eis-Chlorcalcium-Mischung gemessen, wobei die Temperatur der Mischung über Nacht von — 20° auf — 7° stieg. Aktivität des Eluates 18,1 C.E./ccm.

66,5 ccm des Eluates wurden 3 Tage in einem rotierenden Cellophandialysator unter 5maligem Wasserwechsel dialysiert. Der dialysierte Saft wurde in einer Platinschale auf dem Wasserbade eingedampft, eine halbe Stunde bei 120° getrocknet und gewogen. Das gesamte Trockengewicht betrug 3,5 mg, davon waren 0,7 mg Mineralsubstanz. Der Carboxylasewert ist dann

$$C.W. = \frac{18{,}1 \,.\, 66{,}5}{3{,}5} = 344.$$

d. h. ungefähr der 1000fache Wert des Rohsaftes.

Weitere Tanninfällungen wurden dann noch an anderen Rohsäften untersucht, die aber alle fast denselben Wert ergaben.

Versuch 87.

Saft 36. 20 g Hefe wurden mit 60 g Wasser drei Stunden mazeriert. Der Hefebrei wurde aber nicht mehr mit Wasser gewaschen. Das Volumen betrug nach Methanol- und Essigsäurezusatz 63 ccm. Nach dem Abschleudern des Eiweiß 52 ccm. Aktivität des Rohsaftes 65,7 C.E./ccm.

20 ccm dieses gekühlten Rohsaftes wurden wie üblich, zu 2,2 ccm Tanninlösung gegeben. Nach dem Zentrifugieren war der überstehende Saft eiweißfrei, ein geringer Tanninüberschuß war vorhanden. Aktivität 71,4 C.E./ccm.

15 ccm des tanningefällten Saftes wurden mit 0,3 g Hautpulver 2 Stunden bei — 20° gehalten. Nach dem Filtrieren betrug des Volumen 13 ccm, die Aktivität des Saftes 78,7 C.E./ccm. — Der Versuch konnte leider wegen Bruch des Gefäßes nicht weiter durchgeführt werden.

Versuch 108—112.

Weitere Tanninfällungsversuche im saurem p_H verliefen ergebnislos.

Wegen Unbrauchbarkeit der Elutionen zu Carboligasemessungen wurden andere Methoden zur Erlangung stabiler gereinigter Säfte angewandt. [1])

Gegenüber den früheren Versuchen wurde die Mazerationsdauer von 3 auf 4½ bis 5 Stunden erhöht, außerdem wurde nicht sofort die ganze Wassermenge zugegeben, sondern zunächst die Hälfte, die andere Hälfte wurde erst vor dem Zentrifugieren zugesetzt. Man erhielt dabei einen steifen Brei, den man zweckmäßig während der Mazerationszeit öfter mit einem Glasstab umrührte. Gewaschen wurde der Hefebrei dann wieder mit der gesamten Wassermenge, dann erfolgte die Eiweißfällung mit derselben Menge Methanol und Essigsäure wie bei den früheren Versuchen beschrieben. Nach dem Abschleudern des Eiweiß wurde der Saft dann in das Kühlbecken der Kältemaschine gehängt. Nach einigen Stunden hatte sich am Boden des Gefäßes eine dicke Eiweißfällung abgesetzt, die durch Adsorption an Kaolin entfernt wurde. Dieser einmal kaolin-adsorbierte Saft ergab nach mehrstündigem Stehen in der Kälte wieder eine Eiweißfällung, die abermals an Kaolin adsorbiert wurde. Nach 4 aneinandergereihten Kaolinadsorptionen fiel selbst nach längerem Stehen in der Kältelösung kein Eiweiß mehr aus. Wesentlich für diese hintereinander geschaltenen Kaolinadsorptionen war, daß keine nennenswerten Mengen Ferment mitadsorbiert wurden.

Versuch 117. Saft 51.

Zu je vier Proben von 10 ccm des Rohsaftes 51, Aktivität 58,1 C.E./ccm, wurden 0,2, 0,4, 0,6 und 0,8 g Kaolin gegeben, 5 Minuten geschüttelt und zentrifugiert. Die Aktivitäten der überstehenden Säfte waren 55,5, 55,15, 49,75 und 51,94 C.E./ccm.

---

[1]) Für die weiteren Versuche wurde uns eine Kältemaschine „Rot-Silber A-S" der Firma Brown-Boveri, Mannheim, von der Notgemeinschaft der deutschen Wissenschaft zur Verfügung gestellt.

Messung mit 0,5 ccm Kochsaft, 0,25 ccm Fermentlösung und 1,25 ccm Puffer (4 mg $CH_3COCOONa$ auf 1 ccm Puffer).

Saft 52. Nach der Methanolfällung wurde das ausgefällte Eiweiß abzentrifugiert und von 20 ccm des klaren überstehenden Saftes eine Trockengewichtsbestimmung ohne vorherige Dialyse gemacht. 1 ccm enthält 32,4 mg Trockensubstanz.

150 ccm dieses Rohsaftes wurden mit 9 g Kaolin, also 0,6 g auf 10 ccm 5 Min. bei Zimmertemperatur geschüttelt und nach dem Zentrifugieren vergleichend mit dem Rohsaft gemessen. Von diesem einmal kaolin adsorbierten Saft wurde dann ebenfalls das Trockengewicht bestimmt. 30 mg/ccm. Die Aktivität des Rohsaftes betrug 67,2, des einmal kaolinadsorbierten Saftes 60,4 C.E./ccm.

Versuch 121.

100 ccm dieses kaolin-adsorbierten Saftes wurden dann nochmals an 6 g Kaolin adsorbiert, (0,6 g Kaolin auf 10 ccm Saft). Die Aktivität dieses Saftes betrug 53,9 C.E./ccm, das Trockengewicht 28,9 mg/ccm. Die Aktivität dieser Säfte blieb während der ganzen Messung konstant.

Versuch 123—126.

An Saft 54, der zunächst zweimal an Kaolin adsorbiert wurde, wurden weitere Kaolinadsorptionen bei saurem p_H untersucht, die aber keine nennenswerte Aktivität besaßen.

Versuch 127—131.

Saft 55 wurde zweimal mit je 0,6 g. Kaolin auf 10 ccm Saft voradsorbiert. An diesem Safte wurden dann weitere Eiweißadsorptionen systematisch in mehreren Versuchsreihen mit 0,4, 0,6 und 0,8 g Kaolin auf 10 ccm Saft untersucht. Als Optimum erwies sich die Adsorption an 0,8 g Kaolin, der überstehende Saft besaß ungefähr die gleiche Aktivität wie der Rohsaft. Daran wurde nochmals eine Adsorption mit 0,8 g. Kaolin geknüpft. Die Aktivität dieses viermal kaolin-adsorbierten Saftes war 38 C.E./ccm. Das Trockengewicht eines ccm nach 2tägiger Dialyse 9 mg, also

C.W. = 4,2

Versuch 141.

Saft 60. 120 g. Hackerhefe wurden mit der $1^1/_2$fachen Gewichtsmenge 30° warmen Wassers zu einem steifen Brei angerührt und

5 Stunden bei 30° mazeriert. Die restlichen 180 ccm Wasser wurden erst vor dem Zentrifugieren zugesetzt. Der abgeschleuderte Hefebrei wurde dann mit 360 ccm Wasser gewaschen, dann erfolgte auf Zusatz von Methanol und Essigsäure die Eiweißfällung. Nach einstündigem Stehen bei —20° wurde das ausgefällte Eiweiß abgeschleudert. Aktivität des Rohsaftes 74,15 C.E./ccm. Der Rohsaft wurde dann im Verlauf von 36 Stunden viermal an Kaolin absorbiert. Selbst nach tagelangem Stehen bei —20° fiel dann kein Eiweiß mehr aus. Mit Salizylsulfosäure ergab er eine starke Fällung. Aktivität des viermal kaolin adsorbierten Saftes 65,87 C.E./ccm. Man sieht also, daß die Fermentadsorption an Kaolin unter den richtigen Bedingungen nur sehr gering ist. Der Saft blieb während der Messung gleichmäßig aktiv.

80 ccm dieses Saftes wurden mit 32 ccm methanolischer Tonerde B (4 ccm auf 10 ccm Saft) eine viertel Stunde geschüttelt und dann noch 2 Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Der überstehende Saft wurde nach dem Zentrifugieren abgegossen, das Adsorbat 3mal mit 64 ccm auf —20° gekühlten 30 prozentigem Methanol gewaschen, dann aber nicht wie bei früheren Versuchen in verdünntem Methanol, sondern in 50prozentigem Glyzerin suspendiert. 50prozentiges Glyzerin ist noch bei — 22° flüssig, außerdem läßt sich das Tonerdeadsorbat viel besser darin suspendieren, besonders wenn das Adsorbat schon vorher durch Verrühren mit kleinen Glasperlen fein verteilt ist. Das Tonerdeadsorbat enthielt nur 3,6, der überstehende Saft 6,33 C.E./ccm.

60 ccm des überstehenden Saftes nach der ersten Tonerdeadsorption wurden mit 15 ccm Tonerde B 90 Minuten bei Zimmertemperatur geschüttelt, dann zentrifugiert. Das Adsorbat besaß 14,9, der überstehende Saft 28 C.E./ccm. Mit Salizylsulfosäure ergab er nur eine geringe Trübung.

55 ccm des überstehenden Saftes nach der zweiten Tonerdeadsorption wurden nochmals an 13,75 ccm Tonerde durch einstündiges Schütteln bei Zimmertemperatur adsorbiert. Nach dem Zentrifugieren wurde das Adsorbat dann wie üblich 3mal gewaschen und endlich in 13,75 ccm verdünntem Glyzerin suspendiert. Die Aktivität des Adsorbates betrug 62,1 ccm C.E./ccm, der überstehende Saft war inaktiv. Das Adsorbat blieb während der Messung konstant aktiv, ja selbst nach 48 stündigem Stehen bei Zimmertemperatur war die Aktivität nur unwesentlich gesunken, nämlich auf 53,2 C.E./ccm.

Saft 62. Tonerdeadsorbat aus 100 ccm Saft und 40 ccm wässriger Tonerde B. Der Saft wurde nur 5 Min. mit der Tonerde geschüttelt, dann sofort zentrifugiert. Nach dem Waschen mit Methanol wurde

das Adsorbat wie üblich in verdünntem Glyzerin suspendiert. Aktivität des Adsorbates 40 C.E./ccm.

C.Q. = 0,0875.

Versuch 143/145.

Je 20 ccm dieses Adsorbates wurden mit 4 ccm gesättigter Na_2HPO_4-Lösung 4 Stunden eluiert und zwar ein Teil bei —20°, der andere bei Zimmertemperatur. Die Elution in der Kälte enthielt 31,62 bei Zimmertemperatur dagegen nur 7,3 C.E./ccm.

C.Q. der aktiven Elution = 0,2036.

Das Tonerdeadsorbat war mit und ohne Kochsaft gemessen gleich aktiv. Darauf wurden Elutionsversuche mit gesättigter primärer Phosphatlösung zum Vergleich mit gesättigter sekundärer unternommen. Es erwies sich am besten, die Elution mit sekundärem Phosphat durchzuführen, da die Elution mit primärem Phosphat kaum aktiv war. Die Elution ergab mit Salizylsulfosäure eine ganz geringe durchscheinende Trübung.

Versuch 154.

In einem weiteren Versuch nach 2 Tonerdevorabsorptionen zeigte sich das Eluat nach 3 stündiger Elution noch aktiver als das Adsorbat. Aktivität des Eluates 16,6, des Adsorbates 12,0 C.E./ccm.

Versuch 157—172.

Messungen mit einem sauren Puffer (p_H 3—4) erwiesen sich bei frischem Mazerationssäften erfolglos. Dagegen erwiesen sich Versuche mit dem gewöhnlichen Acetatpuffer p_H = 4,7, zu dem einige Tropfen Natronlauge bis zur schwachsauren Reaktion gesetzt waren, sehr günstig. Es trat sogar mit dem fast neutralen Puffer eine mehr als doppelte Aktivitätssteigerung gegenüber dem bisher gebrauchten Puffer ein. Im folgenden wurden daher die Säfte immer doppelt gemessen, einmal mit dem bisherigen Acetatpuffer (p_H 4,7) zum anderen mit dem fast neutralen Puffer p_H 6,6.

Versuch 178.

Rohsaft 79 enthielt mit Acetatpuffer (p_H 4,7) gemessen 27,58 mit dem fast neutralen Puffer dagegen 75,72 C.E./ccm, also fast die dreifache Aktivitätssteigerung. Nach 4 Kaolinadsorptionen betrugen die

Aktivitäten mit beiden Puffern gemessen 8,8 und 48,06 C.E./ccm, also fast die sechsfache Aktivitätssteigerung. Das Tonerdeadsorbat nach der früher beschriebenen Methode hergestellt enthielt 28,6 bzw. 84,1 C.E./ccm.

20 ccm des Adsorbates wurden mit 4 ccm gesättigter sekundärer Phosphatlösung 3 Stunden bei —22° eluiert. Das Eluat gab nur eine geringe Eiweißreaktion. Die Aktivitäten für beide Puffer betrugen 25,2 bzw. 41, C.E./ccm.

10 ccm des Eluates wurden 24 Stunden gegen Wasser dialysiert, dann eingedampft, getrocknet und gewogen. Trockengewicht pro ccm 3,16 mg, also

C.W. = 12,9.

Versuch 183.

Saft 81. 100 ccm 4 mal an Kaolin adsorbierter Saft, Aktivitäten 23,8 bzw. 73,6 C.E./ccm,

CQ = 0,1562

wurden mit 25 ccm Tonerde B eine Stunde bei Zimmertemperatur geschüttelt, dann zentrifugiert. Das dreimal gewaschene Adsorbat enthielt 38,8 C.E./ccm, der überstehende Saft 64,8 C.E./ccm.

100 ccm des überstehenden aktiven Saftes nach der ersten Tonerdeadsorption wurden nochmals an 20 ccm Tonerde B adsorbiert. Der überstehende Saft war völlig eiweißfrei und nicht aktiv. Das Adsorbat wurde in der üblichen Weise gewaschen und dann in 20 ccm Glyzerin suspendiert. Aktivität des Adsorbates 62,8 bzw. 137,7 C.E./ccm.

20 ccm des Adsorbates wurden mit 2 ccm gesättigter schwachsaurer Phosphatlösung (p_H 6,7) 16 Stunden bei —20° eluiert. Aktivität des Eluates für beide Puffer 41,36 und 101, C.E. pro ccm.

15 ccm dieses aktiven Eluates wurden bei —22° 8 Tage gegen 30prozentigen Methanol dialysiert. Die Dialyse wurde in einem Zylinder aus feinem Glasgestänge, der mit Cellophanpapier bespannt war, ausgeführt. Diese Dialysiertrommel, die das Eluat enthielt, wurde in einen mit 30prozentigem Methanol gefüllten Glaszylinder gehängt, der in der Kältemischung stand. Nach 8tägiger Dialyse enthielt die Elution noch 24 bzw. 42,6 C.E./ccm.

Versuch 188.

Neues Adsorbat aus 100 ccm viermal kaolinadsorbiertem Saft 81 und 25 ccm Tonerde B. Die Suspension wurde 1,5 Stunden bei Zim-

mertemperatur geschüttelt, das Adsorbat enthielt 87,1, der überstehende Saft 41,4 C.E./ccm.

C.Q. des Adsorbates = 0,1630
C.Q. des überstehenden Saftes = 0,1533

100 ccm des überstehenden Saftes nach der ersten Tonerdeadsorption wurden nochmals mit 15 ccm Tonerde B eine Stunde bei Zimmertemperatur, dann noch 3 Stunden bei — 20° gehalten. Das Adsorbat enthielt mit beiden Puffern gemessen 50 bzw. 99,4 C.E./ccm.

Dieses Adsorbat wurde mit 1,5 ccm einer gesättigten Phosphatlösung p_H 6,7 16 Stunden bei —20° eluiert. Das Eluat war nur ganz schwach eiweißhaltig. Aktivität des Eluates 57,2 bzw. 113,6 C.E./ccm.

10 ccm des Eluates wurden in einer Dialysierhülse 13 Tage bei — 20° dialysiert. Das Methanol wurde während der Dialyse fünfmal gewechselt. Aktivität des dialysierten Eluates

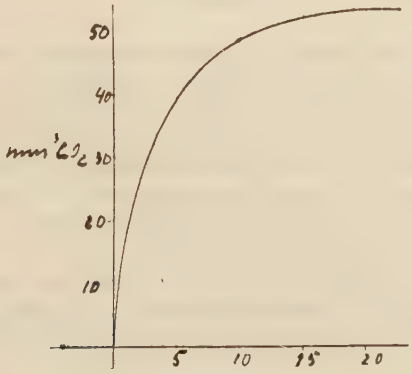
mit Acetatpuffer 0,3 mol. p_H = 6,7 27,66 C.E./ccm
mit Phosphatpuffer 0,3 mol. p_H = 6,4 28,38 C.E./ccm

1 ccm enthielt 0,89 mg Trockensubstanz. Also

C.W. = 31,9.

Versuch 195.

15 ccm dieses dialysierten Eluates wurden mit 0,5 g Kaolin drei Minuten geschüttelt, dann sofort zentrifugiert. Der überstehende Saft war eiweißfrei. Entwickelte Menge CO_2 in den ersten 5 Minuten



39,58 mm³. Vorher war der Atmungstrog 5 Min. bei offenem Hahn zum Temperaturausgleich im Thermostaten geschüttelt worden.

Eine Trockengewichtsbestimmung ergab 0,23 mg/ccm, also

C.W. = 137,7,

d. h. ungefähr der 400fache Wert des Rohsaftes.

Wie schon bei den früheren Versuchen, bestätigte sich auch hier die Erfahrung, daß es wohl möglich ist, einen eiweißfreien aktiven Saft zu erhalten. Die Aktivität läßt aber im Verlauf der Messung sehr stark nach, sodaß diese Messung für eine Carboligasemessung nicht brauchbar sind. In den zweiten 5 Min. der Messung wurden 9,57 mm^3 CO_2 entwickelt, in den dritten 3,44, in den vierten nur 0,76, (Kurve auf vorstehender Seite).

Versuch 194.

Versuche mit anderen Puffern am Rohsaft 83.

1) gewöhnlicher Acetatpuffer 0,3 mol. pH 4,7
2) schwach saurer Acetatpuffer pH 6,7
3) Phosphatpuffer, 0,3 mol. 1 : 1 pH 6,7
4) Phosphatpuffer, 0,3 mol. 2 : 1 pH 6,4

Die Aktivitäten dieser Messungen waren: 28,27; 62; 60,9 und 64,44 C.E./ccm. Für die weiteren Versuche wurde stets 0,3 mol. Phosphatpuffer Ph 6,4 verwandt.

Ebenso wurde nur noch methylalkoholische Tonerde C benutzt. Konzentration an Al_2O_3/ccm = 3,31 mg. Diese methanolische Tonerde C erwies sich als ganz vorzügliches Eiweißfällungsmittel, ohne bei richtiger Anwendung nennenswerte Fermentmengen zu adsorbieren.

Versuch 196.

Zu 100 ccm des viermal kaolin-adsorbierten Saftes 83, Aktivität 36 C.E./ccm, wurden unter Schütteln 25 ccm wässrige Tonerde C Konzentration an Al_2O_3/ccm = 4,96 mg gegeben, dreiviertelstunden bei Zimmertemperatur geschüttelt und dann abgeschleudert. Aktivität des überstehenden Saftes 35,7 C.E. pro ccm. Dieser Saft enthielt nur Spuren Eiweiß. Er wurde nochmals an 15 ccm Tonerde C adsorbiert. Nach dem Zentrifugieren Aktivität 25,45 C.E./ccm. Trockengewichtsbestimmungen ohne Dialyse.

4mal kaolin adsorbierter Saft 83 28,8 mg/ccm. Überstehender Saft nach der ersten Tonerdeadsorption 17,8 mg/ccm.

Nach der zweiten Tonerdeadsorption 15,6 mg/ccm.

Versuch 197.

Zu 100 ccm kaolinadsorbiertem Saft 83 wurden 25 ccm methanolische Tonerde C gegeben und unter öfterem Umschütteln 3,5

Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Nach dem Zentrifugieren betrug die Aktivität des überstehenden Saftes 34,26 C.E./ccm. Dieser aktive überstehende Saft wurde nochmals durch 16stündiges Stehen bei —20° an 25 ccm Tonerde adsorbiert. Nach dem Zentrifugieren enthielt der Saft nur geringe Spuren Eiweiß. Die Aktivität betrug 35,56 C.E./ccm. Dieser Saft wurde 5 Tage bei —20° gegen verdünntes Methanol dialysiert. Das Methanol wurde jeden Tag erneuert.

In dem Dialysat waren geringe Mengen Eiweiß ausgefallen. Diese wurden in 1 ccm Phosphatpuffer suspendiert. Eine Messung war selbst nach 1 Min. unmöglich, da der Saft zu stark aktiv war. Die Suspension des ausgefällten Eiweiß' in Phosphatpuffer wurde zentrifugiert, der klare überstehende Saft war ebenfalls nach 1 Min. nicht mehr meßbar. Prüfung mit Salizylsulfosäure ergab Eiweißflockung.

Versuch 199.

Saft 85. Neuer Rohsaft aus 250 g. Münchener Hefe. Aktivität des Rohsaftes 84,47, nach 4 Kaolinadsorptionen 87,8 C.E./ccm.

Versuch 202.

100 ccm dieses Saftes wurden mit methanolischer Tonerde C (25 ccm) 3,5 Stunden bei Zimmertemperatur geschüttelt. Aktivität des überstehenden Saftes 77,6 C.E./ccm. Dieser einmal an Tonerde adsorbierte Saft wurde nochmals an 25 ccm Tonerde adsorbiert und 40 Stunden bei —20° aufbewahrt. Nach dem Abschleudern der Tonerde enthielt der Saft 59,7 C.E./ccm. Da dieser Saft mit Salizylsulfosäure noch eine Flockung ergab, wurden 100 ccm durch kurzes Schütteln an 10 g Kaolin adsorbiert. Nach dem Abschleudern des Kaolins ergab eine Probe nur noch Spuren Eiweiß. Da dieser Saft aber durch geringe Mengen Kaolin leicht getrübt war, wurde er durch ein gehärtetes Filter filtriert. Die Aktivität des jetzt klaren Saftes betrug 43,1 C.E./ccm.

Dieser Saft wurde 6 Tage bei —20° gegen verdünnten Methanol dialysiert unter täglichem Methanolwechsel. Während dieser Zeit war ein geringer Eiweißniederschlag am Boden der Cellophanhülse ausgefallen. Der inaktive überstehende Saft wurde zum Teil abgegossen, ein anderer Teil, 20 ccm mit dem ausgefallenen Eiweiß suspendiert. Nach dem Zentrifugieren enthielt der klare Saft nur Spuren Eiweiß. Die Aktivität betrug 74,04 C.E./ccm. 1 ccm enthielt 6,02 mg Trockensubstanz.

C.W. = 12,03.

Eine Sacharasebestimmung ergab: **S. W. = 0,00577.**

Versuch 203.

Zu 100 ccm des viermal kaolinadsorbierten Saftes 83 wurden 25 ccm methanolische Tonerde C gegeben und 19 Stunden bei Zimmertemperatur geschüttelt. Der überstehende Saft nach dem Abschleudern der Tonerde enthielt nur geringe Mengen Eiweiß. Aktivität 22,42 C.E./ccm. Dieser Saft wurde 8 Tage bei —20° dialysiert. Der über dem ausgefallenen Eiweiß stehende inaktive Saft wurde abgegossen, das ausgefallene Eiweiß und Hefegummi in 20 ccm 30prozentigem Methanol suspendiert, zentrifugiert und der schwach eiweißhaltige Saft gemessen. Aktivität 49,95 C. E./ccm. Aus dem Trockengewicht 3,43 mg/ccm errechnet sich

C.W. = 14,56
C.Q. = 0,3312.

Versuch 204.

100 ccm Saft 85 (4 mal kaolin-adsorbiert) wurden mit 25 ccm Tonerde C einige Zeit geschüttelt, dann 25 Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Der nach dem Abschleudern der Tonerde überstehende Saft, der noch eiweißhaltig war, enthielt 50,5 C. E./ccm.

115 cm dieses Saftes wurden 5 Tage bei — 20° dialysiert. Die inaktive über dem ausgefallenen Eiweiß stehende Flüssigkeit wurde sorgfältig abgegossen, das ausgefallene Eiweiß zunächst mit einem Ventilator, dann noch einige Zeit im Exsiccator getrocknet. Das Cellophan wurde dann fein zerschnitten und mit 10 ccm H_2O ausgelaugt. Aktivität 136,7 C. E./ccm. Die Cellophanschnitzel wurden dann nochmals mit 20 ccm H_2O eine viertel Stunde ausgelaugt. Aktivität dieses Saftes 50,6 C. E. pro ccm. Das Trockengewicht eines ccm der ersten Auslaugung betrug 21,8 mg, also

C.W. = 6,27.

Versuch 208.

100 ccm Saft 85 wurden mit 25 ccm methanolischer Tonerde C 25 Stunden bei Zimmertemperatur öfter geschüttelt. Der überstehende Saft nach dem Abschleudern der Tonerde enthielt noch viel Eiweiß. Die Aktivität betrug 58,4 C. E./ccm.

100 ccm dieses Saftes wurden 5 Min. mit 10 g Kaolin geschüttelt, dann noch 1 ¼ Stunden bei Zimmertemperatur gehalten. Nach dem

Zentrifugieren enthielt der Saft nur noch Spuren Eiweiß, die Aktivität war durch die Kaolinadsorption auf 32,8 C.E./ccm gesunken. Dieser Saft wurde in der beschriebenen Weise 6 Tage bei — 20° gegen verdünntes Methanol dialysiert. Der über dem ausgefallenen Eiweiß stehende inaktive Saft wurde vorsichtig abgegossen, der geringe Niederschlag mit 20 ccm H_2O aufgerührt, die trübe Lösung zentrifugiert. Der überstehende klare Saft, der nur Spuren Eiweiß enthielt, wurde mit und ohne Kochsaft gemessen.

Aktivität mit Kochsaft 87,5 C. E./ccm.
Aktivität ohne Kochsaft 81,8 C. E./ccm.

C.W. = 21,7
C.Q. = 0,2937.

Versuch 209.

Zu 200 ccm 4 mal kaolinadsorbiertem Saft ließ man 500 ccm Tonerde C unter Schütteln des Gefäßes langsam einfließen. Der Saft wurde dann noch 24 Stunden bei Zimmertemperatur gehalten. Nach dem Abschleudern der Tonerde betrug die Aktivität des Saftes mit und ohne Kochsaft gemessen 57,53 und 59,45 C.E./ccm.

230 ccm dieses Saftes wurde dann an 23 g Kaolin durch einstündiges Schütteln bei Zimmertemperatur adsorbiert. Aktivität dieses Saftes mit Kochsaft gemessen 18,72, ohne Kochsaft 22,95 CE./ccm.

200 ccm dieses Saftes wurden 12 Tage dialysiert. Der inaktive überstehende Saft wurde abgegossen, das ausgefällte Eiweiß in 50 ccm H_2O aufgerührt, zentrifugiert und wieder mit und ohne Kochsaft gemessen. Aktivität mit Kochsaft 44,9, ohne Kochsaft 47,2 C.E./ccm.

In diesem Falle war der dialysierte Saft ohne Kochsaft gemessen sogar noch etwas aktiver als der mit Kochsaft gemessene. Aus dem Trockengewicht eines ccm = 5,16 mg berechnet sich

C.W. = 9,16.

Versuch 210.

Zu 100 ccm des viermal kaolinadsorbierten Saftes 85 wurden 25 ccm methanolische Tonerde unter Schwenken des Gefäßes gegeben; die Lösung wurde 24 Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Die Tonerde wurde abgeschleudert, durch Adsorption an Kaolin fand dann eine weitere Befreiung an Eiweißstoffen statt. Dieser Saft wurde 7 Wochen bei — 20° dialysiert. Nach dieser Zeit wurde der über dem ausgefällten Eiweiß stehende inaktive Saft

abgegossen, das Eiweiß in 30 ccm H_2O suspendiert, zentrifugiert und gemessen. Aktivität des Saftes mit Kochsaft gemessen 29,41 ohne Kochsaft 19,14 C.E./ccm.

Das Trockengewicht betrug 2,93 mg/ccm, also

C.W. = 10,04
C.Q. = 0,1406
C.Q. = 0,1807

Versuch 211.

Saft 86. 250 g Hefe wurden 5 Stunden bei 30° mazeriert. Der methanolische Rohsaft enthielt mit und ohne Hefe-Kochsaft gemessen 55,15 und 56,27 C.E./ccm. Der Rohsaft wurde zweimal an Kaolin adsorbiert und zwar kamen auf 10 ccm Saft 0,6 g. Kaolin. Aktivität dieses Saftes 53,96 C.E./ccm.

Versuch 212.

Zu 100 ccm dieses Saftes wurden 30 ccm methanolische Tonerde C gegeben und 48 Stunden bei — 20° aufbewahrt. Nach dem Abschleudern der Tonerde betrug die Aktivität des Saftes 37,55 C.E./ccm.

Dieser aktive wenig Eiweiß enthaltende Saft wurde nochmals durch kurzes Schütteln bei + 20° an 20 ccm methanolische Tonerde adsorbiert. Die Tonerde wurde abgeschleudert, der überstehende Saft war eiweißfrei und nicht aktiv. Das Tonerdeadsorbat wurde dreimal gewaschen, dann in 20 ccm verdünntem Glyzerin suspendiert. Aktivität des Tonerdeadsorbates 90,76 C.E./ccm.

Das Tonerdeadsorbat wurde mit 4 ccm 0,3 mol. Phosphatpuffer pH 6,4 17 Stunden bei —20° eluiert. Die Elution enthielt nur geringe Mengen Eiweiß. Aktivität der Elution mit und ohne Kochsaft gemessen 82,4 bzw. 76,85 C.E./ccm.

Die Elution wurde 16 Tage bei — 20° gegen 30prozentigen Methanol dialysiert. Während dieser Zeit trübte sich die Lösung, das Eiweiß setzte sich erst ab, nachdem das Glyzerin völlig herausdialysiert war. Der überstehende Saft wurde abgegossen, das Eiweiß in 30 ccm H_2O suspendiert und zentrifugiert, sowohl die Lösung als auch das abzentrifugierte Eiweiß waren beide inaktiv. Der bei der Dialyse über dem ausgefällten Eiweiß stehende Saft enthielt mit und ohne Kochsaft gemessen 7,15 bzw. 6,1 C.E./ccm. Aus dem Trockengewicht 0,8 mg/ccm ergibt sich dann

C.W. = 8,9.

Versuch 213.

Zu 500 ccm des kaolinadsorbierten Saftes **86** wurden 150 ccm Tonerde B gegeben und diese Suspension 2 Tage bei — 20° gehalten. Die Tonerde wurde abgeschleudert, die Aktivität des Saftes betrug mit und ohne Kochsaft gemessen 32,8 bzw. 30,77 C.E./ccm. Dieser Saft enthielt nur Spuren Eiweiß.

Versuch 214.

100 ccm dieses Saftes wurden drei Tage bei — 20° dialysiert. Der über dem ausgefällten Eiweiß stehende Saft wurde abgegossen, Aktivität 14,3 C.E./ccm. Das Eiweiß wurde mit 30 ccm H_2O aufgerührt, zentrifugiert und der klare Saft mit und ohne Kochsaft gemessen. Aktivitäten 30,64 und 17,88 C.E./ccm.

In diesem Falle findet mit Kochsaft im Gegensaft zu früheren Dialysen eine Aktivitätssteigerung statt. Aus dem Trockengewicht 1,33 mg/ccm ergibt sich

C.W. = 23
C.Q. = 0,1372

Versuch 215.

2 Proben von 200 ccm des Versuches 213 wurden mit je 40 ccm Tonerde B 10 Min. bei + 20° geschüttelt. Das Ferment wird bei dieser Arbeitsweise völlig an die Tonerde adsorbiert. Die beiden überstehenden Säfte waren inaktiv. Die Tonerdeadsorbate wurden wie üblich gewaschen und dann in je 40 ccm 50prozentigen Glyzerin suspendiert. Die Aktivitäten der beiden Tonerdeadsorbate waren 88 bzw. 74,88 C.E./ccm. Die beiden Adsorbate je 40 ccm wurden mit je 8 ccm 3 mol. Phosphatpuffer p_H 6,4 15 Stunden bei —20° eluiert. Aktivitäten der beiden Elutionen 85,58 bzw. 71,4 C.E./ccm.

Die beiden Eluate wurden zusammengegeben, Volumen 82 ccm und 14 Tage bei — 20° dialysiert. Nach dieser Zeit war das Glyzerin völlig herausdialysiert. Der über dem ausgefällten Eiweiß stehende Saft wurde abgegossen. Aktivitäten mit und ohne Kochsaft 10,93 bzw. 3,15 C.E./ccm. Das Volumen des abgegossenen Saftes betrug 160 ccm. Das Trockengewicht von 1 ccm 0,95 mg, das Trockengewicht für 160 ccm also 152 mg. Das bei der Dialyse ausgefällte Eiweiß wurde in 80 ccm H_2O suspendiert, die Suspension war nicht aktiv. Das Trockengewicht dieser 80 ccm betrug 32 mg. Das Gesamttrockengewicht der dialysierten Elusion beträgt also 184 mg. Daraus berechnet sich

C.W. = 34,98.

An dieser Stelle möchte ich nicht verfehlen, meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. Wolfgang Langenbeck meinen besonderen Dank auszusprechen für die mir durch Rat und Tat bei der Ausarbeitung der Doktor-Arbeit geleistete Hilfe.

Der Germania-Brauerei, insbesondere Herrn Dr. Hallermann sind wir für die uns liebenswürdigerweise zur Verfügung gestellte Hefe zu großem Dank verpflichtet.

Lebenslauf.

Ich, Heinz Wrede, wurde am 22. August 1910 als Sohn des Lokomotivführers Heinrich Wrede und seiner Ehefrau Paula geb. Hesselmann zu Münster i/W. geboren. Von Ostern 1920 ab besuchte ich das Städtische Realgymnasium zu Münster i/W., wo ich Ostern 1929 meine Reifeprüfung ablegte. Ich widmete mich darauf dem Studium der Chemie an der Universität Münster. Ich bestand im November 1931 mein erstes, im Dezember 1932 mein zweites Verbandsexamen. Seitdem habe ich mich mit der Anfertigung meiner Doktor-Arbeit über die Reinigung der Carboxylase beschäftigt.